

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. Oktober 2003 (09.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/082906 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C07K 7/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT03/00065

(22) Internationales Anmeldedatum:  
10. März 2003 (10.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
A 495/2002 28. März 2002 (28.03.2002) AT(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): JSW-RESEARCH FORSCHUNGLABOR  
GMBH [AT/AT]; Rankengasse 28, A-8020 Graz (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WINDISCH, Manfred  
[AT/AT]; Rankengasse 28, A-8020 Graz (AT).(74) Anwälte: BEER, Manfred usw.; Lindengasse 8, A-1070  
Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Veröffentlicht:

ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NEUROTROPHIC AND NEUROPROTECTIVE PEPTIDES

(54) Bezeichnung: NEUROTROPHE UND NEUROPROTEKTIVE PEPTIDE

(57) Abstract: The invention relates to novel peptides, whose individual components are L-amino acids or D-amino acids. Said peptides are used as active ingredients in medicaments for treating diseases in which the increased occurrence of free radicals plays a pathophysiological role, or for treating diseases involving acute hypoxia or ischaemia in an organ system of the body, in particular in the central nervous system, or for treating iron-storage diseases such as Hallervorden-Spatz syndrome, or for treating neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease, the Lewy body variant of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multi-system atrophy, Lewy body dementia or Huntington's chorea and all syndromes that are similar to said neurodegenerative diseases.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden neue Peptide, deren Einzelbestandteile L-Aminosäuren oder D-Aminosäuren sind. Diese Peptide kommen als Wirkstoffe in Arzneimitteln zur Anwendung bei der Therapie von Erkrankungen, bei denen das vermehrte Auftreten von freien Radikalen eine pathophysiologische Rolle spielt, oder bei der Therapie von Erkrankungen mit akuter Hypoxie oder Ischämie in einem Organsystem des Körpers, insbesondere im Zentralnervensystem, oder bei der Therapie von Eisenspeichererkrankungen, wie der Hallervorden-Spatz'schen Erkrankung, oder bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer'schen Erkrankung, der Lewy Body Variante der Alzheimer'schen Erkrankung, der Parkinson'schen Erkrankung, der Multisystem Atrophie, der Lewy Body Demenz oder der Huntington's Chorea, und allen diesen neurodegenerativen Erkrankungen ähnlichen Zustandbildern.

Neurotrophe und neuroprotektive PeptideTechnisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide von 4 bis 14 Aminosäuren  
5 Länge. Die erfindungsgemäßen Peptide können als Wirkstoff in  
Arzneimitteln zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen des  
Zentralnervensystems, wie dem Morbus Alzheimer, der Lewy Body  
Demenz, der Parkinson'schen Erkrankung, dem Morbus Huntington  
(Chorea), der Multisystem-Atrophie und anderen ähnlichen  
10 Erkrankungen verwendet werden.

Stand der Technik

Bei neurodegenerativen Erkrankungen treten im Allgemeinen als  
gemeinsames Merkmal Aggregate von Proteinen im Gehirn auf. Im Falle  
15 der Alzheimer'schen Erkrankung handelt es sich um die sogenannten  
senilen Plaques, sind extrazelluläre Eiweißablagerungen, die  
vornehmlich aus Amyloid-Beta-Peptiden bestehen und um die  
sogenannten neurofibrillären Tangles, intrazelluläre Proteinknäuel  
aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Beim Morbus Parkinson finden  
20 sich intrazelluläre Einschlusskörper, bestehend aus aggregiertem  
Alpha-Synuclein. Nach den neuesten wissenschaftlichen Befunden  
konnten solche Einschlusskörper, nämlich Lewy Bodies auch bei mehr  
als 70% der familiären und sporadischen Alzheimer-Erkrankten  
nachgewiesen werden, man findet sie auch bei Patienten, die am Down-  
25 Syndrom leiden. Aggregate von Alpha-Synuclein in Gliazellen treten  
bei der Multisystem Atrophie auf. Analog dazu finden sich Aggregate  
vom Prionprotein bei der Creutzfeld-Jakob Erkrankung und verwandten  
Erkrankungen, und letztendlich Ablagerungen von Huntingtin bei  
Huntington Chorea.

30

Bei manchen der Erkrankten liegen mutierte Proteine vor, die ein  
besonders ausgeprägtes Aggregationsverhalten besitzen. Bei der  
Mehrzahl der Patienten aber bestehen die Aggregate aus normalen  
Wildtyp-Proteinen. Es werden verschiedene Ursachen angenommen, die  
35 das Löslichkeitsverhalten der Proteine plötzlich verändern, wobei  
zum Beispiel erhöhter oxidativer Stress während des  
Alterungsprozesses eine wesentliche Rolle spielen dürfte. Auch  
Veränderungen in der Kapazität verschiedener proteinabbauender  
Enzyme kommen als Ursache in Frage, da durch Störungen falsch  
40 modifizierte Eiweiße entstehen können, die sich dann ablagern und

von verschiedenen Entsorgungsenzymen nicht mehr weiter prozessiert werden können.

Ein anderer auslösender pathophysiologischer Mechanismus besteht in  
5 einem gestörten Gleichgewicht zwischen aggregatorischen und anti-  
aggregatorischen Proteinen. Die Entdeckung, dass das synaptische  
Protein Alpha-Synuclein den Hauptbestandteil der sogenannten Lewy  
Bodies darstellt, und dass Mutationen in diesem Protein zu  
familiärer Parkinson'scher Erkrankung führen, haben dieses Eiweiß in  
10 den Mittelpunkt des Interesses wissenschaftlicher Forschung gerückt.  
Neben Alpha-Synuclein existieren als weitere Vertreter dieser  
Proteinfamilie Gamma-Synuclein und Beta-Synuclein, sowie das  
kürzlich entdeckte Synoretin (Surguchov et al., *Mol. Cell.*  
*Neurosci.* 13(2): 95-103 [1999]).

15

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen tritt eine  
Verschiebung des Mengenverhältnisses zwischen den einzelnen  
Synucleinen dahingehend auf, dass der relative Anteil von Alpha-  
Synuclein erhöht wird. Es konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass  
20 Beta-Synuclein, ein sehr naher Verwandter von Alpha-Synuclein, in  
der Lage ist, die Aggregation von Alpha-Synuclein dosisabhängig zu  
hemmen (Hashimoto et al., *Neuron* 32(2): 213-23 [2001]). Versuche in  
Zellkulturen, bei denen eine Störung der normalen Zellproliferation  
und Differenzierung durch Überexpression von Alpha-Synuclein  
25 ausgelöst wurde, zeigten ebenfalls eine im therapeutischen Sinn  
günstige Wirkung von Beta-Synuclein, welches das Anhaften, Überleben  
und Auswachsen von Neuriten in diesen Kulturen wieder normalisierte.  
Mäuse, die für Alpha-Synuclein transgen sind, zeigen eine erhöhte  
Produktion dieses Eiweißes und weisen daher ein gestörtes Verhältnis  
30 in den Mengen zwischen Alpha- und Beta-Synuclein auf. Sie bilden im  
Laufe des Alters intraneuronale Einschlusskörper ähnlich den Lewy  
Bodies aus und zeigen auch fortschreitende motorische Störungen, die  
mit der Funktionsstörung beim Morbus Parkinson vergleichbar sind.  
Kreuzt man diese Tiere mit Beta-Synuclein transgenen Tieren, die  
35 eine erhöhte Expression dieses Eiweißes zeigen, so lässt sich auf  
wesentlich höherem Niveau in der Gesamtexpression der Synucleine  
eine Homöostase wiederherstellen. Als Folge wird die Anzahl der  
Einschlusskörper hoch signifikant reduziert und der  
charakteristische neuronale Funktionsverlust komplett verhindert.

40

Alpha-Synuclein dürfte aber auch eine besonders wichtige Rolle bei der Pathologie der Alzheimer'schen Erkrankung spielen. Dafür spricht die Tatsache, dass ein Teil dieses Proteins, die NACP (Non-Amyloid Component Protein) Domäne, als Teil der senilen Plaques nachgewiesen werden konnte (Yoshimoto et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* 92, 9141-5 [1995] und WO-9506407), und zudem die Tatsache, dass - wie oben erwähnt - etwa 70% der Alzheimer Erkrankten in verschiedenen Hirnarealen Lewy Bodies aufweisen, in denen sich ebenfalls Alpha-Synuclein findet (Eizo et al., *Neurosci. Lett.* 290(1), 41-4 [2000]). In einem transgenen Mausmodell erhöht Beta-Amyloid die Akkumulation und die Neurotoxizität von Alpha-Synuclein (Masliah et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* 98(21): 12245-50 [2001]). Zusätzlich könnte Alpha-Synuclein als synaptisches Protein eine wichtige Rolle bei der initialen synaptischen Degeneration spielen, und somit eine Schlüsselrolle in der Pathogenese einnehmen.

Derzeit stehen keinerlei kausal wirksame Therapien der Alzheimer'schen Erkrankung, der Lewy Body Demenz, der Parkinson'schen Erkrankung oder anderer neurodegenerativer Erkrankungen zur Verfügung. Eine Verhinderung der abnormen Proteinaggregation durch einen endogenen Faktor könnte somit einen ersten Schritt in diese Richtung darstellen. Da Alpha- und Beta-Synuclein zusätzlich mit verschiedenen endogenen Signaltransduktionskaskaden wie der Proteinkinase C, oder der Phospholipase D2 und verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren, wären über diese Wirkwege zusätzliche positive Einflüsse, die sich neuroprotektiv auswirken könnten, denkbar.

Die Verwendung von Beta-Synuclein und insbesondere davon abgeleiteten Peptiden in Zusammenhang mit Alpha-Synuclein ist bekannt, siehe etwa Oktapeptide gemäß WO-A-02/04482 und drei weitere Peptide in WO-A-02/04625. Die WO-A-002/0020 und WO-A-01/60794 beschreiben die Verwendung von Beta-Synuclein als ganzes Molekül bzw. von Methoden, die dessen Expression in vivo steigern zur Therapie von neurologischen Erkrankungen, die mit Alpha-Synuclein in Zusammenhang stehen. Die WO-A-01/60794 lehrt insbesondere auch die Verwendung eines Peptides mit der Aminosäure-Sequenz MDVFMKGLSMAKEGV, welches den N-terminalen Aminosäuren 1 bis 15 des Beta-Synucleins entspricht, zur Behinderung der Bindung von Alpha-Synuclein und Beta-Amyloid. Die WO-A-01/60794 liefert jedoch keinen

Nachweis für eine tatsächliche protektive Wirkung dieses Peptides auf lebende, neuronale Zellen und enthält keine Hinweise auf andere wirksame Peptide in diesem Sequenzbereich. Kürzere Peptide wären jedoch für den Einsatz als Arzneimittel sehr vorteilhaft, da sich im  
5 Allgemeinen mit abnehmender Kettenlänge die Probleme der chemischen und biologischen Stabilität sowie der Bioverfügbarkeit stark vermindern.

#### Darstellung der Erfindung

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile zu vermeiden. Erfindungsgemäß werden Peptide vorgeschlagen, welche aus der Gruppe

15 DVFMKGLSMAKEGV  
VFMKGLSMAKEGV  
FMKGLSMAKEGV  
MKGLSMAKEGV  
KGLSMAKEGV  
GLSMAKEGV  
20 LMAKEGV  
SMAKEGV  
MAKEGV  
AKEGV  
KEGV  
25 MDVFMKGLSMAKEG  
MDVFMKGLSMAKE  
MDVFMKGLSMAK  
MDVFMKGLSMA  
MDVFMKGLSM  
30 MDVFMKGLS  
MDVFMKGL  
MDVFMKG  
MDVFMK  
MDVFM  
35 MDVF  
DVFMKGLSMAKEG  
DVFMKGLSMAKE  
DVFMKGLSMAK  
DVFMKGLSMA  
40 DVFMKGLSM

5  
10  
15  
20

DVFMKGLS  
DVFMKGL  
DVFMKG  
DVFMK  
DVFM  
DVF  
GLSMAKEG  
GLSMAKE  
GLSMAK  
GLSMA  
GLSM  
GLS  
GL  
LSMAKEG  
LSMAKE  
LSMAK  
LSMA  
LSM  
LS

ausgewählt sind.

Diese erfindungsgemäßen Peptide sind von der N-terminalen Sequenz des Beta-Synucleins abgeleitet und antagonisieren den Einfluß toxischer oder vitalitätsschädigender Noxen, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen vorliegen.

Überraschenderweise ergab sich die aus dem Stand der Wissenschaft und Technik nicht ableitbare Tatsache, dass bereits einzelne Peptide, die nur die Hälfte bzw. sogar nur ein Drittel der in WO-0160794 beschriebenen Sequenz aus 15 Aminosäuren umfassen, in Modellen von pathologischen Vorgängen, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen vorliegen oder vermutet werden, ausgezeichnete Wirkung entfalten; so etwa das Heptapeptid SMAKEGV und das Pentapeptid LSMAK.

Im Rahmen der Erfindung liegen nicht nur Peptide, deren Einzelbestandteile L-Aminosäuren sind, sondern auch Peptide, deren Einzelbestandteile D-Aminosäuren sind.

Ebenso im Rahmen der Erfindung in Betracht gezogen sind N- oder C-terminal veränderte Peptide.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Peptide  
5 sind in den Unteransprüchen offenbart.

Die Erfindung betrifft weiters Arzneimittel, welche die erfindungsgemäßen Peptide als pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

10 Die Peptide der Erfindung können auf verschiedene Weise synthetisch hergestellt werden.

Die chemische Synthese eines Peptids stellt ein konventionelles Verfahren dar und kann zum Beispiel durch die Merrifield Solid  
15 Phasen Synthesetechnik erreicht werden (Merrifield, J., *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 [1963]; Kent et al., *Synthetic Peptides in Biology and Medicine*, 29 ff eds. Alitalo et al., Elsevier Science Publishers 1985; Haug, J.D. Peptide Synthesis and the protecting group strategy, *American Biotechnology Laboratory*, 5 (1):40-47  
20 [1987]). Verfahren der chemischen Peptidsynthese beinhalten auch die Verwendung automatischer Peptidsynthetizer unter Verwendung kommerziell erhältlicher geschützter Aminosäuren wie zum Beispiel Biosearch (Modell 9500 und 9600), Applied Biosystems Inc. (Modell 430; Miligen (Modell 9050) und andere. Zusätzlich zu den chemischen  
25 Verfahren können diese Peptide mittels rekombinanter Technologie in Zellen von Bakterien, Pilzen oder von Säugetieren hergestellt und mittels herkömmlicher Verfahren gereinigt werden.

Unabhängig davon, ob die Synthese der erfindungsgemäßen Peptide über  
30 chemische Wege oder durch rekombinante Technologien durchgeführt wird, kann es insbesondere zur Erhöhung der Stabilität nach Einführung in den zu therapierenden Organismus wünschenswert sein, die Peptide zu modifizieren. Dazu können beispielsweise folgende Methoden angewendet werden:

35

#### Vorteilhafte Wege zur Ausführung der Erfindung

1) Kovalente Modifikationen, bei denen vorherbestimmte Aminosäure-Reste des Peptids mit organischen Derivatisierungs-substanzen an ausgewählten Seitenketten oder endständigen Resten reagieren  
40 können. Zum Beispiel reagieren Cysteinyll Reste mit Alpha-

- Haloacetaten und korrespondierenden Aminen wie der Chloroessigsäure oder dem Chloroacetamid und ergeben dabei Carboxymethyl oder Carboxyamidomethyl Derivate. Cysteinyl Reste können auch durch die Reaktion mit Bromotrifluoroaceton, Alpha-Bromo-Beta (5-Imidozoyl) Propionsäure, Chloroacetyl-phosphat, N-Alkylmalemiden, 3-Nitro-2-Pyridyldisulfid, Methyl-2-Pyridyldisulfid, p-Chloromerkuribenzoat, 2-Chloromerkuri-4-Nitrophenol oder Chloro-7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-Diazol derivatisiert werden. Auch die Aminosäure Histidin kann leicht durch die Reaktion mit Diethylprocarbonat bei einem pH Wert von 5,5 - 7 derivatisiert werden, da diese Substanz relativ spezifisch für die Histidyl Seitenkette ist. Parabromophenylbromid ist ebenfalls eine Möglichkeit, wobei die Reaktion vorzugsweise in 0,1 molaren Natriumcacodylate bei pH 6,0 ausgeführt wird.
- 2) Lysin und aminoterminalen Reste können auch mit Succinat oder anderen Carboxylsäure-Anhydriden derivatisiert werden. Die Reaktion mit diesen Agenzien hat den Effekt, die Ladung des Lysinyl Restes umzukehren. Andere geeignete Reagenzien zur Derivatisierung Alphaamino enthaltender Reste inkludieren Imido-Ester wie Methyl-Bicollinimidat, Pyridoxal-Phosphat, Pyridoxal, Chloroborohydrid, Trinitrobenzonsulfonsäure, O-Methyl Isoharnstoff, 2, 4 Pentandion und Transaminase katalysierte Reaktionen mit Glyoxylat. Die Arginyl Reste können durch die Reaktion mit einer oder mehreren konventionellen Reagenzien wie Phenylglyoxal, 2,3 Butandion, 1,2-Cyclohexandion und Ninhydrin modifiziert werden. Die Derivatisierung der Arginyl Reste erfordert, dass die Reaktion unter alkalischen Bedingungen wegen des hohen PK Wertes der Guanidin Gruppe durchgeführt wird. Zusätzlich können diese Reagenzien auch mit Gruppen des Lysin, sowie mit der Arginin-Epsilon Aminogruppe reagieren.
- 3) Tyrosyl Reste sind bekannte Targets für die Einführung von spektralen Markierungen durch die Reaktion mit aromatischen Diazonium Substanzen oder Tetranitromethan. Am häufigsten werden N-Acetylimidazol und Tetranitromethan verwendet, um O-Acetyltyrosin und 3-



Nitroderivate zu produzieren.

- 4) Die Carboxyl Seitengruppe (Aspartyl oder Glutamyl) wird selektiv durch Reaktion mit Carbodimiden ( $R'-N-C-N-R'$ ) wie 1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinyl(4-Ethyl)) Carbodiimid oder 1-Ethyl-3-(4-Azonia-4,4-Dimethylpentyl)-Carbodiimid modifiziert. Aspartyl und Glutamyl Reste werden durch die Reaktion mit Ammonium Ionen in Asparaginyll und Glutaminyll Reste verwandelt. Glutaminyll und Asparaginyll Reste werden häufig zu den entsprechenden Glutamyl und Aspartyl Resten deamidiert.
- 5) Andere Modifizierungen beinhalten die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die Phosphorylierung der Hydroxylgruppen von Seryl und Threonyll Resten, die Methylierung der Alpha Aminogruppe von Lysin, Argenin und Histidin Seitenketten, sowie die Acetylierung der N-terminalen Aminogruppe und die Amidierung der C-terminalen Carboxylgruppen.

Solche Derivatisierungen können dazu dienen, die Löslichkeit, Absorption, die biologische Halbwertszeit und ähnliches zu verbessern. Die Derivatisierungen könnten alternativ auch dazu dienen, etwaige ungewünschte Nebeneffekte der Proteine zu minimieren.

#### Bestimmung der biologischen Aktivität:

Da die Zielrichtung der Therapie mit den erfindungsgemäß vorgestellten Peptiden verschiedene neurodegenerative Erkrankungen sind, wurden unterschiedliche Modellsysteme für den Nachweis der biologischen Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Peptide bei neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt. In der Folge werden die einzelnen verwendeten Modellsysteme und die damit erzielten Ergebnisse beschrieben.

Gemeinsam ist diesen biologischen Testsystemen, daß aus Hühnerembryonen gewonnene kortikale Neuronen acht Tage in Kulturplatten kultiviert und sodann einer spezifischen Noxe ausgesetzt werden (Pettmann et al., *Nature* 281(5730): 378-80

[1979]).

Dazu werden einen Tag alte, befruchtete Hühnereier bei  $+12 \pm 0,1$  °C und  $80 \pm 5\%$  Luftfeuchte acht Tage lang inkubiert. Am embryonalen Tag 0 werden die Eier in einen Bebrütungsinkubator transferiert und bis zum embryonalen Tag 8 bei  $38 \pm 0,5$  °C und  $55 \pm 5\%$  inkubiert. Nach Entnahme der Gehirne werden die Kortex isoliert, homogenisiert und Neuronen in Primärkultur genommen (Kulturbedingungen: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 20% v/v fötales Kälberserum, 0,01% Gentamycin, 1 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin,  $+37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luftfeuchte). Nach 8 Tagen in Kultur wird das zu prüfende Peptid zugesetzt (Endkonzentrationen von 1,56 bis 200  $\mu\text{M}$ ) und die spezifizierte Noxe ausgeführt. Bei jedem Versuch wird eine geschädigte Kontrolle und eine Vehikel-Kontrolle mitgeführt. Nach Ablauf der spezifizierten Stressperiode wird der Anteil der noch lebenden Neuronen mit einem metabolischen kolorimetrischen Assay bestimmt (die Umsetzung des gelben Chromophors MTT zu einem blauen Formazan-Produkt erfolgt nur durch lebende Zellen).

20

Zu den Aminosäure-Sequenzen der zitierten Peptide siehe Tabelle 1.

#### Beispiel 1: Serum-Entzugsassay

25 Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren (Reduktion der Zumischung von fötalem Kälberserum auf 2% v/v) wird ein langsamer und progredienter Zelltod durch Apoptose und Neurodegeneration herbeigeführt. Dies simuliert die Störungen in der Stimulation der Neuronen mit Nervenwachstumsfaktoren, die als eine der möglichen Ursachen neurodegenerativer Erkrankungen angenommen werden. Die Wirksamkeit der neuen Peptide in der Verhinderung des Zelltods wurden gemessen.

35 Insgesamt hatten in diesem Test 31 von 45 getesteten Peptidfragmente neuroprotektives, anti-apoptotisches Potential. Besonders effizient waren dabei die Substanzen BH#16 und BH#37 deren Effekte 150% über den Effekten der Kontrolle (=100%) lagen. Beim Oktapeptid BH#7 (Sequenz LSMKEGV) lagen die Effekte bei 450%.

40 Beispiel 2: Chronische Störung des Kalzium Stoffwechsels durch Ionomycin

Es wird vermutet, dass es bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen aufgrund metabolischer Fehlfunktionen zu einer chronischen Kalziumüberladung kommt, die über die Aktivierung verschiedener Enzymsysteme letztendlich Zelltod bewirkt. Bei dem  
5 vorliegenden Modell wird diese Schädigung durch eine Zugabe von Ionomycin in methanolischer Lösung (Endkonzentration:  $10\mu\text{M}$ ) über 24 Stunden hinweg induziert. Methanol, in Medium verdünnt, dient als Vehikel-Kontrolle.

10 In diesem ischämischen Schädigungsmodell waren 6 Substanzen neuroprotektiv wirksam. Interessant sind vor allem 3 Substanzen: BH#8, BH#13 und BH#34 führten zu einer Steigerung der Zellvitalität auf ca. 150%.

15 Beispiel 3: Oxidativer Stress durch Eisenchlorid

Langdauernde Behandlung mit Eisenchlorid stellt einen chronischen oxidativen Stress dar, der Nervenzellen, aber auch andere Zellen, zum Absterben bringt. Da Störungen im Eisenhaushalt sowohl für den  
20 Morbus Alzheimer als auch für den Morbus Parkinson, insbesondere aber bei Eisenspeichererkrankungen wie der Hallervorden-Spatz Erkrankung, beschrieben werden, stellt dieses Modell ein relevantes Testsystem dar. Am 8. Kulturtag werden Nervenzellen durch Zugabe von  $10\mu\text{l}$   $\text{FeCl}_2$ -Lösung geschädigt (Endkonzentration:  $1\text{mM}$ ). Geschädigt  
25 wird für 24 Stunden.

In diesem Assay wiesen 23 Peptidfragmente eine eindeutige neuroprotektive Wirkung auf, davon lag bei mehr als der Hälfte der Substanzen eine Steigerung der Vitalität auf über 150% vor. Mehr  
30 Substanzen als in jedem anderen Schädigungsassay führten zu einer Zellvitalitätssteigerung auf über 200% (BH#8, BH#10, BH#11, BH#13) bzw. 250% (BH#15, BH#6, BH#27, BH#28).

Beispiel 4: Oxidativer Stress durch Wasserstoffsuperoxyd

35

Durch die Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd zum Kulturmedium werden freie Radikale erzeugt, die in Nervenzellkulturen massiven Zelltod bewirken. Da dies einen ubiquitären Mechanismus der Zellschädigung darstellt, hat dieses Modell sowohl für akute als auch chronische  
40 Nervendegeneration Relevanz. Am 8. Kulturtag wird den Nervenzell

kulturen  $H_2O_2$  zu einer Endkonzentration von 100  $\mu M$  zugesetzt.

Insgesamt 30 Peptide zeigten hier neuroprotektives Potential. Mit Effekten von über 200% verglichen mit der geschädigten Kontrolle (= 100%) waren die Substanzen BH#5, BH#8, BH#9 und BH#29 besonders auffallend. Eine neuronale Vitalitätssteigerung auf 145% und mehr zeigten auch die Peptide BH#13, BH#29, BH#37, BH#38 und BH#46.

#### Beispiel 5: Amyloid-Beta Aggregations Assay

10

Beta-Amyloid - Peptide stellen in aggregierter Form ein potentes Neurotoxin dar, dessen Zugabe zu Nervenzellkulturen zu einem raschen und fortschreitenden Zelltod führt. Da Beta-Amyloid Peptide eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer darstellen, ist dieses Modell als besonders relevant anzusehen.

Bei dem vorliegenden biologischen Test handelt es sich um ein speziell für dieses Projekt entwickeltes Verfahren zur Testung anti-aggregatorischen Substanzpotentials. Die neu synthetisierten Peptide werden direkt einer frischen Lösung von Amyloid-Beta Peptiden zugegeben, um die Bildung neurotoxischer Aggregate zu verhindern. Die Auswirkung dennoch entstehender Aggregate auf das Wachstum und Überleben von Nervenzellkulturen ist der Meßparameter.

Sechs der getesteten 45 Peptidfragmente konnten die neurotoxische Wirkung von  $\beta$ -Amyloid<sub>25-35</sub> teilweise kompensieren. Auffallend sind die Peptide BH#24 und BH#26, die zu einer Steigerung der neuronalen Vitalität um 44 bzw. 74% führen. Allerdings konnten andere Peptide, deren Synthese schwierig war oder weil nur wenig Material verfügbar war, nur einmal getestet werden. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass das eine oder andere Peptid ebenfalls wirkungsvoll sein könnte.

#### Beispiel 6: Zytotoxische Wirkung von prä-aggregiertem Beta-Amyloid Peptid

35

Im Gegensatz zum zuvor geschilderten Test arbeitet dieser mit präformierten neurotoxischen Amyloid-Aggregaten. Um diese zu erzeugen, wird ein aus den Aminosäuren 25 bis 35 bestehendes Beta-Amyloidpeptid ( $\beta$ -A<sub>(25-35)</sub>) in phosphatgepuffertem Kochsaz gelöst (1

40

mM) und für mindestens 72 Stunden zur Komplexbildung bei Raumtemperatur gelagert. Am 8. Kulturtag wird diese Lösung in einer Endkonzentration von 20  $\mu$ M in die Kulturen pipettiert und nach 24 Stunden Exposition wird wie üblich der Anteil der lebenden Zellen  
5 bestimmt.

21 von 45 untersuchten Peptiden zeigten neuroprotektives Potential. Die Effekte lagen zwischen 120 und 150% gegenüber der ungeschädigten Vehikel-Kontrolle, wobei teilweise Effekte bereits in sehr niedrigen  
10 Dosierungen erkennbar sind.

Bis auf den Aggregationsassay (Beispiel Nr. 5), für den nur ein Versuchsdurchgang stattfand, sind in allen Abbildungen der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (Stabw) von zumindest  
15 zwei unabhängigen Experimenten ( $n > 6$ ) dargestellt. D.h. die Durchführung der Versuche erfolgte an unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen Zellpräparationen und von verschiedenen Personen. Für einige Peptide wurden zwei Nummern vergeben (#1=#23 oder #6=#35 oder #7=#43), die Ergebnisse mit diesen Peptiden wurden aber nur  
20 einmal dargestellt. Ein Peptid konnte nicht getestet werden, da es nicht in Lösung gebracht werden konnte (#49). Mit einigen anderen Substanzen gab es Probleme bei der Herstellung, weshalb nur geringe Mengen verfügbar waren und die Substanzen nicht in allen Assays ausgetestet werden konnten (#12, 14, 17, 35 und #48). Generell waren  
25 nur wenige Peptide in keinem Assay wirksam (, 18, , 32, , 41, ). In nur einem Screening Assay wirksam waren die Peptide mit der Nummer # 12, 20, 30, 33, 39 und 45,. Wie aus den Abbildungen ersichtlich, sind die Standardabweichungen, d.h. die Schwankungen zwischen den unabhängigen Experimenten, teilweise recht groß. Diese Schwankungen  
30 sind auf Stabilitätsprobleme zurückzuführen.

Tabelle 1:

Aminosäure-Sequenzen der getesteten Beta-Synuclein - Peptide und ihre Resultate in den biologischen Testsystemen der Beispiele 1 bis 6

Code	AA-Sequenc	# AA	2%Assay (% viability)	lonomyci n (% viability)	FeCl2 (% viability)	H2O2 (% viability)	β-Amyl (% viability)	AβP reag g. (diff vs C) 23%
BH#1	DVFMKGLSMAKEGV	14	132±28,6		125±51,3			
BH#2	VFMKGLSMAKEGV	13		133±6,2	184±119,5	140±33,2		
BH#3	FMKGLSMAKEGV	12	146±59,2		144±77,7			
BH#4	MKGLSMAKEGV	11	155±16,2		148±31,3		151±31,1	
BH#5	KGLSMAKEGV	10	143±52,4	137±18,4	145±70,0			
BH#6	GLSMAKEGV	9			153±71,5	130±30,0	120±11,2	
BH#7	LSMAKEGV	8			183±113,7	122±22,9	124±12,3	
BH#8	SMAKEGV	7	139±29,6	156±19,4				23%
BH#9	MAKEGV	6			123±81,0			
BH#10	AKEGV	5	139±34,8					
BH#11	KEGV	4				132±50,0	131±11,4	
BH#12	MDVFMKGLSMAKEG	14	156±82,9	X				
BH#13	MDVFMKGLSMAKE	13	166±11,1			151±54,2	129±14,0	
BH#14	MDVFMKGLSMAK	12	122±26,9	X	X	X	X	
BH#15	MDVFMKGLSMA	11	149±49,8			126±28,0		
BH#16	MDVFMKGLSM	10				144±20,4	132±44,6	
BH#17	MDVFMKGLS	9	169±103,1	124±7,3	150±116,8	X	144±26,7	
BH#18	MDVFMKGL	8						
BH#19	MDVFMKG	7			131±33,6	127±32,1	132±14,9	20%
BH#20	MDVFMK	6			132±38,7			
BH#21	MDVFM	5	151±68,8			126±10,3	137±33,0	
BH#22	MDVF	4	169±103,1		140±36,0		120±10,6	
BH#24	DVFMKGLSMAKEG	13	125±19,0				122±3,0	
BH#25	DVFMKGLSMAKE	12	169±43,8				149±21,0	
BH#26	DVFMKGLSMAK	11						
BH#27	DVFMKGLSMA	10				147±7,9	128±14,6	
BH#28	DVFMKGLSM	9				130±77,3	144±8,6	
BH#29	DVFMKGLS	8			157±22,1	154±42,7		
BH#30	DVFMKGL	7					126±32,0	
BH#31	DVFMKG	6			138±47,5	124±37,6	143±55,9	
BH#32	DVFMK	5						
BH#33	DVFM	4					145±20,9	
BH#34	DVF	3					136±13,4	19%
BH#36	GLSMAKEG	8	183±14,9		125±26,6		134±23,9	
BH#37	GLSMAKE	7				144±32,5		
BH#38	GLSMAK	6	172±74,4		152±72,8	147±14,3		
BH#39	GLSMA	5						
BH#40	GLSM	4	164±72,5		144±30,4			
BH#41	GLS	3						
BH#42	GL	2		120,0±16,4			128±18,4	
BH#44	LSMAKEG	7	183±97,1	121,0±28,0				
BH#45	LSMAKE	6	148±53,4					
BH#46	LSMAK	5				147±22,0		
BH#47	LSMA	4				135±7,5		
BH#48	LSM	3		120±15,4			120±26,5	

Die nachfolgende Tabelle 2 fasst die Charakteristiken der wichtigsten Substanzen aus diesem Screening zusammen. Bei diesen Peptiden handelt es sich um die im Rahmen der Erfindung bevorzugten Peptide.

5

Tabelle 2:

Zusammenfassende Darstellung der hinsichtlich ihrer neuroprotektiven Wirkung auffälligsten Beta-Synuclein - Peptide

Code	AA-Sequenz:	AA	Wirksam in:	Bemerkungen
BH#8	SMAKEGV	7	5 von 7 assays	kleines Peptid, extrem hohe Effekte, in sehr vielen Assays wirksam, therapeutisch interessant
BH#13	MDVFMKGLSMAKE	13	5 von 7 assays	in sehr vielen Assays wirksam
BH#16	MDVFMKGLSM	10	4 von 7 assays	in sehr vielen Assays wirksam
BH#2 6	DVFMKGLSMAK	11	2 von 7 assays	als Gruppe besonders interessant, weil von der Aminosäuresequenz sehr ähnlich, sehr hohe Effekte
BH#2 7	DVFMKGLSMA	10	4 von 7 assays	
BH#2 8	DVFMKGLSM	9	4 von 7 assays	
BH#4 6	LSMAK	5	2 von 7 assays	hohe Effekte, kleinstes Peptid, therapeutisch interessant

In der Beschreibung, den Ansprüchen und in den Tabellen 1 und 2 steht

- 25 A für D- oder L-Alanin,  
D für D- oder L-Asparaginsäure,  
E für D- oder L-Glutaminsäure,  
F für D- oder L-Phenylalanin,  
G für D- oder L-Glycin,  
30 K für D- oder L-Lysin,  
L für D- oder L-Leucin,  
M für D- oder L-Methonin,  
S für D- oder L-Serin und  
V für D- oder L-Valin.

35

Dosierungen und Verabreichungsformen:

Im Allgemeinen werden die erfindungsgemäßen Verbindungen in

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)

therapeutisch effektiven Mengen in pharmazeutisch akzeptablen Trägern oder Lösungsmitteln verabreicht. Solche Träger inkludieren (sind aber nicht beschränkt auf) physiologische Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose, Wasser, Glycerin, Ethanol und  
5 Kombinationen daraus. Die jeweilige Formulierung soll an die Art der Verabreichung angepasst sein.

Die Zusammensetzung kann wenn nötig auch unterschiedliche Mengen von Feuchtespendern oder Emulgatoren oder pH-puffernden Substanzen  
10 enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann eine flüssige Lösung sein, eine Suspension, eine Emulsion, eine Tablette, eine Pille, eine Kapsel, eine Retard-Formulierung oder ein Pulver. Die Zubereitung kann auch als Suppositorium mit traditionellen Bindemitteln und Trägersubstanzen wie Triglyzeriden hergestellt  
15 werden. Orale Formulierungen können Standardträger wie Mannitol, Laktose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsacharin, Zellulose, Magnesiumcarbonat und andere in pharmazeutischem Reinheitsgrad enthalten. Verschiedene Verabreichungssysteme sind bekannt und können verwendet werden, um die therapeutische Anwendung der  
20 erfindungsgemäßen Substanzen zu gewährleisten, wie z.B. die Verkapselung in Liposomen, Mikropartikeln, Mikrokapseln u.ä..

Die Verabreichungsform wird in Übereinstimmung mit routinemäßigen Verfahren als pharmazeutische Verabreichungsform adaptiert für intravenöse Administration an Menschen oder anderen Säugetieren  
25 zubereitet. Typischerweise sind die Zusammensetzungen für die intravenöse Verabreichung Lösungen in steriler isotonischer wässriger Pufferlösung. Wenn notwendig, kann die Zubereitung auch Lösungsvermittler und lokal wirksame Anästhetika enthalten, um den Schmerz an der Injektionsstelle zu lindern.

30 Im Allgemeinen werden die Bestandteile entweder separat oder vermischt in einer Dosierungseinheit zur Verfügung gestellt. Zum Beispiel als trockenes lyophilisiertes Pulver oder wasserfreies Konzentrat in einem hermetisch versiegelten Container wie einer  
35 Ampulle, an der die Menge des aktiven Pharmakons vermerkt ist.

Wenn die Darreichungsform als Infusion verabreicht werden muss, kann sie in einer Infusionsflasche, die steriles Wasser oder Salzlösung in pharmazeutischem Reinheitsgrad enthält, aufgelöst werden. Wenn  
40 immer die Zubereitung durch Injektion verabreicht wird, kann eine



Ampulle mit sterilem Wasser für Injektionszwecke oder Kochsalzlösung so zur Verfügung gestellt werden, dass die Einzelbestandteile vor der Administration bestimmungsgerecht vermischt werden können.

- 5 Die therapeutischen Substanzen, die in der Erfindung beschrieben werden, können sowohl als neutrale Form, als auch als Salz formuliert werden. Pharmazeutisch akzeptierbare Salze inkludieren solche, die mit den freien Aminogruppen gebildet wurden, z.B. jene, die von der Salzsäure oder der Oxalsäure stammen und solche, die mit
- 10 freien Carboxylgruppen, wie jene abgeleitet von Natrium, Kalium, Ammonium, Calcium, Eisenoxyden, Isopropylamin, Triethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und anderen gebildet werden.

- Die Menge des Therapeutikums, das in der Erfindung beschrieben wird,
- 15 muss für die Behandlung der speziellen Erkrankung oder des Zustands effektiv sein, wird von der Natur der Erkrankung bzw. des Zustands abhängen und durch standardisierte klinische Verfahren bestimmt. Die genaue Dosis, die in der Erfindung angewendet werden muss, hängt auch von der Art der Verabreichung und dem Schweregrad der
- 20 Erkrankung oder der Störung ab, und diese Menge sollte nach Einschätzung des erfahrenen Arztes unter Berücksichtigung der spezifischen Patientenumstände angepasst werden. Geeignete Dosierungs-bereiche für die intravenöse Verabreichung liegen im Allgemeinen zwischen 20 - 4.000µg des aktiven Bestandteils pro kg
- 25 Körpergewicht. Geeignete Dosierungen für intranasale Anwendungen liegen im Bereich zwischen 0,01 pg pro kg Körpergewicht bis zu 1mg pro kg Körpergewicht. Effektive Dosierungen für orale Anwendungen liegen im Bereich von 1mg bis 1.000mg pro kg Körpergewicht und Tag. Die effektiven Dosierungen werden von Dosiswirkungskurven, die aus
- 30 *in vitro* Modellen oder Tiermodelltestsystemen abgeleitet werden, extrapoliert.

## Patentansprüche:

1. Neues Peptid, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
- 5 DVFMKGLSMAKEGV  
VFMKGLSMAKEGV  
FMKGLSMAKEGV  
MKGLSMAKEGV  
KGLSMAKEGV  
10 GLSMAKEGV  
LSMAKEGV  
SMAKEGV  
MAKEGV  
AKEGV  
15 KEGV
- MDVFMKGLSMAKEG  
MDVFMKGLSMAKE  
MDVFMKGLSMAK  
MDVFMKGLSMA  
20 MDVFMKGLSM  
MDVFMKGLS  
MDVFMKGL  
MDVFMKG  
MDVFMK  
25 MDVFM  
MDVF  
DVFMKGLSMAKEG  
DVFMKGLSMAKE  
DVFMKGLSMAK  
30 DVFMKGLSMA  
DVFMKGLSM  
DVFMKGLS  
DVFMKGL  
DVFMKG  
35 DVFMK  
DVFM  
DVF  
GLSMAKEG  
GLSMAKE  
40 GLSMAK

- 5  
10
- GLSMA  
GLSM  
GLS  
GL  
LSMAKEG  
LSMAKE  
LSMAK  
LSMA  
LSM  
LS.
2. Peptide nach Anspruch 1, wobei die Einzelbestandteile L-Aminosäuren sind.
- 15 3. Peptide nach Anspruch 1, wobei die Einzelaminosäuren D-Aminosäuren sind.
4. Peptide nach Anspruch 1 oder 2, bei denen N-terminal die Aminosäure Prolin substituiert ist.
- 20 5. Peptide nach Anspruch 1 oder 2, bei denen C-terminal die Aminosäure Prolin substituiert ist.
6. Peptide nach Anspruch 1 oder 2, bei denen N-terminal und C-terminal Aminosäure Prolin substituiert ist.
- 25 7. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die N-terminal acetyliert sind.
- 30 8. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die C-terminal amidiert sind.
9. Peptide nach Anspruch 7 oder 8, die N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert sind.
- 35 10. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure Valin (V) durch die Aminosäure Prolin (P) ersetzt ist.
- 40 11. Arzneimittel zur Anwendung bei der Therapie von

Erkrankungen, bei denen das vermehrte Auftreten von freien Radikalen eine pathophysiologische Rolle spielt, gekennzeichnet durch wenigstens ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

- 5
12. Arzneimittel zur Anwendung bei der Therapie von Erkrankungen mit akuter Hypoxie oder Ischämie in einem Organsystem des Körpers, insbesondere im Zentralnervensystem, gekennzeichnet durch wenigstens ein
- 10 Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
13. Arzneimittel zur Anwendung bei der Therapie von Eisenspeichererkrankungen, wie der Hallervorden-Spatz'schen Erkrankung, gekennzeichnet durch wenigstens
- 15 ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
14. Arzneimittel zur Anwendung bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer'schen Erkrankung, der Lewy Body Variante der Alzheimer'schen
- 20 Erkrankung, der Parkinson'schen Erkrankung, der Multisystem Atrophie, der Lewy Body Demenz oder der Huntington's Chorea, und allen diesen neurodegenerativen Erkrankungen ähnlichen Zustandsbildern, gekennzeichnet durch wenigstens ein Peptid nach einem der Ansprüche 1
- 25 bis 10 als Wirkstoff.
15. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur oralen Verabreichung zubereitet ist.
- 30 16. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur rektalen Verabreichung zubereitet ist.
17. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur inhalativen Verabreichung zubereitet ist.
- 35 18. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur transdermalen Verabreichung zubereitet ist.
19. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur
- 40 transmukosalen Verabreichung zubereitet ist.

20. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur  
Verabreichung auf dem Weg von wirkstoffhaltigen Implantaten  
zubereitet ist.
- 5 21. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur  
intracerebroventrikulären Verabreichung zubereitet ist.
- 10 22. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur  
Verabreichung durch Injektion zubereitet ist.
23. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur  
transnasalen Verabreichung zubereitet ist.
- 15 24. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, das zur  
Verabreichung durch Infusion zubereitet ist.
- 20 25. Verwendung wenigstens eines Peptides gemäß der Ansprüche 1  
bis 9 zum Herstellen eines Arzneimittels gemäß einem der  
Ansprüche 11 bis 14.
26. Verwendung nach Anspruch 25 zum Herstellen eines  
Arzneimittels gemäß der Ansprüche 11 bis 24.